

PCT/EP 98/08382

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D FEB 1999
WIPO PCT

09/582779



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

EJV

Bescheinigung

EP98/88382

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen, Genkonstrukt
enthaltend dieses Gen und seine Verwendung"

am 15. Januar 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N und C 07 H der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 28. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Nietiedt

Aktenzeichen: 198 01 120.2

ren zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen, dadurch
zeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphat-
oxylase-Gen defizienten Mikroorganismus einen Vector
legt, der ein intaktes Orotidin-5'-Phosphatdecarboxy-
gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen
den Ansprüchen 1 bis 3 zusammen mit mindestens einem
Gen enthält, und diesen Mikroorganismus auf oder in
Kulturmedium ohne Uracil anzieht.

ieren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als
eine lineare DNA verwendet wird.

ren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen defizienter Organismus ein *Ashbya gossypii* Stamm verwendet wird.

iren nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavin-
gruppe in den Mikroorganismus eingebracht wird.

idung einer Gen-Sequenz oder seiner Homologen gemäß
Sich 1 bis 3 als Selektionsmarker.

idung nach Anspruch 15 in *Ashbya gossypii*.

lavin-Biosynthesegene aus
Prokaryotischen Organismen, die mit
die Verwendung solcher

2 (Leucin-Auxotrophie),
Kanamycin-Resistenz) in
Ashbya gossypii eingebracht
Marker met15
east, Vol. 12, 1996: 939 -
sen Marker ist, daß ent-
gering ist und/oder aber
ben werden muß. In jedem
f den Verlust des Markers
Mikroorganismen nicht oder
lich, so daß weitere Gene
mehr in die Mikroorganismen
halb wünschenswert einen
formationseffizienz auf-
eine Gegenselektion er-

-Gen (= URA3-Gen) aus
klassischen Marker, der
und mit dessen Hilfe Gene
transformiert werden
ird die Isolierung art-
erung des entsprechenden
Sequenzen aus Pichia
ces marxianus, Yamadazyma
iger, Aspergillus oryzae,
ides, Phycomyces blakes-
Aspergillus awamori be-
Vol. 60, No. 12, 1994 :
3, No. 23, 1990: 7183,
992: 255 - 260, Yeast,
10, 1994: 1601 - 1612, Curr.
1. Acids Res., Vol. 16,
16, 1989: 159 - 163, Gene,
116, 1992: 59- 67, Mol. Gen.
cl. Acids Res., Vol. 16,
Vol. 18, No. 23, 1990: 7183
- 540).

29, 1984: 113 - 124)
omyces cerevisiae sogar eine
A3) in Prokaryonten wie
n und als Selektionsmarker

Orotidin-5'-Phosphat
dieses Gen und

5 Beschreibung

Die Erfindung
mit der Sequenz
konstrukt entsteht

10 Verwendung. Die
Organismen entstehen
mit der Sequenz

Weiterhin besteht
15 von Uracil aus
Einbringen vor

Vitamin B2, also
essentiell. Bei

20 und Rachenschwülsten
falten und ähnlich
minderte Sehschwäche
und Kindern kann
auftreten. Viele
25 besondere als
mittelzusatz. Beispielsweise in

Die Herstellung
mikrobiell (s. z.B.

30 Ullmann's Encyclopedia
Bei den chemischen
in mehrstufiger
relativ kostspielig
gesetzt werden

35 von Riboflavin
organismen. Als
Stoffe, wie Z.B.
Riboflavin durch
oder Ashbya gossypii

40 al., eds. Merck
z.B. Candida,
Bacillus, Clostridium
Produzenten bei

10.10.98
oder seinen Homologen

1.

) NO: 1 beispielsweise
rkürzte Sequenzen, Einzel-
nichtcodierenden DNA-
ID NO: 1 besitzen auf
60 %, bevorzugt von
n mindestens 80 %, ganz
über den gesamten in

NO: 1 Derivate wie bei-
hen. Die Promotoren, die
eschalten sind, können
che, durch Insertion(en)
hne daß aber die Funktio-
beeinträchtigt sind. Des
ränderung ihrer Sequenz
tt durch wirksamere
usgetauscht werden.

verstehen, deren
-200 vor dem Startkodon
ion und/oder die Protein-
ird.

er seine Homologen aus
iaceae, besonders bevor-
Eremothecium, Ashbya oder
us Mikroorganismen der
ter Ashbya gossypii iso-

t sind die URA3-Gen-
gen zu verstehen, die mit
vorteilhafterweise zur
verknüpft wurden. Bei-
regulatorischen Sequenzen
ressoren binden und so
eren. Zusätzlich zu diesen
ürliche Regulation dieser
genen noch vorhanden sein
worden sein, so daß die
die Expression der Gene
er auch einfacher aufgebaut
lichen Regulationssignale

Bei genetisch
gossypii (Vit:
URA3-Gen aus :
Escherichia c
5 ten komplement
von Genen in :

Es wurde desh
entsprechende
10 klonieren. Ve
der Literatur
sierung mit U
nukleotide au
dener Orotidi
15 "cDNA-library
waren erfolgl
Piredda et al
Gene, Vol. 11
Genet., Vol.

20 Aufgabe der v
selektionierb
fach gegensei
das Einbringe

25 Diese Aufgabe
Phosphatdecar
Homologen, di
aufweisen, ge

30 Unter Homolog
carboxylase-G
Allelvariante
der abgeleite
mologie, ganz
35 weisen. Die v
SEQ ID NO: 1
funktionelle
stitution vor
Sequenz erhäl

40 abgeleiteten
das Einbringe
sollte. Solle
im erfindungs
trophen Mikro
45 decarboxylase
nelle Gene da
führen, verwe

2 10.10.00

In der DE 44 20 785 wurden sechs Riboflavin-Biosynthesegene aus *Ashbya gossypii* beschrieben, sowie Mikroorganismen, die mit diesen Genen transformiert wurden und die Verwendung solcher Mikroorganismen zur Riboflavinsynthese.

5 Bisher werden Gene über die Marker leu2 (Leucin-Auxotrophie), thr4 (Threonin-Auxotrophie) oder kan (Kanamycin-Resistenz) in pilzliche Riboflavinproduzenten wie *Ashbya gossypii* eingebracht (WO 92/00379). In Hefen wird als weiterer Marker met15 (Methionin-Auxotrophie, Cost et al., Yeast, Vol. 12, 1996: 939 - 10 941) beschrieben. Von Nachteil bei diesen Marker ist, daß entweder die Transformationseffizienz sehr gering ist und/oder aber zur Selektion ständig Antibiotika gegeben werden muß. In jedem Fall ist jedoch eine Gegenselektion auf den Verlust des Markers unter Erhalt der eingebrachten Gene im Mikroorganismen nicht oder 15 nur unter einem sehr hohen Aufwand möglich, so daß weitere Gene mit diesen Markern in der Regel nicht mehr in die Mikroorganismen eingebracht werden können. Es ist deshalb wünschenswert einen Selektionsmarker, der eine hohe Transformationseffizienz aufweist, leicht selektionierbar ist und eine Gegenselektion ermöglicht, zu haben.

20 Das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= URA3-Gen) aus *Saccharomyces cerevisiae* ist einer der klassischen Marker, der die gewünschten Eigenschaften besitzt und mit dessen Hilfe Gene in Mikroorganismen wie Hefen und Pilze transformiert werden 25 können. In einer Reihe von Arbeiten wird die Isolierung art-spezifischer URA3-Gene bzw. die Isolierung des entsprechenden Gens aus Pilzen (= pyrG) sowie deren Sequenzen aus *Pichia stipitis*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yamadazyma ohmeri*, *Candida maltosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, 30 *Aspergillus nidulans*, *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Penicillium chrysogenum*, und *Aspergillus awamori* beschrieben (Appl. Environ. Microbiol., Vol. 60, No. 12, 1994 : 4245 - 4254, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183, J. Ferment. Bioeng., Vol. 73, No 4, 1992: 255 - 260, Yeast, 35 Vol. 9, 1993: 677 - 681, Yeast, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Curr. Genet., Vol. 23, 1993: 205 - 210, Nucl. Acids Res., Vol. 16, No. 5, 1988: 2339, Curr. Genet., Vol. 16, 1989: 159 - 163, Gene, Vol. 61, 1987: 385 - 399, Gene, Vol. 116, 1992: 59- 67, Mol. Gen. Genet., Vol. 224, 1990: 269 - 278, Nucl. Acids Res., Vol. 16, 40 No. 16, 1988: 8177, Nucl. Acids Res., Vol. 18, No. 23, 1990: 7183 und Curr. Genet., Vol. 27, 1995: 536 - 540).

Arbeiten von Rose et al. (Gene, Vol. 29, 1984: 113 - 124) zeigten, daß das URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* sogar eine 45 entsprechende Mutation (pyrF-Gen = URA3) in Prokaryonten wie *Escherichia coli* komplementieren kann und als Selektionsmarker sinnvoll verwendet werden kann.

M 10.10.00

Bei genetischen Arbeiten zur Riboflavinsynthese von *Ashbya gossypii* (Vitamin B2-Synthese) zeigte sich jedoch, daß das URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder das pyrF-Gen aus *Escherichia coli* keine Uracil auxotrophen *Ashbya gossypii*-Mutanten komplementieren können und deshalb diese Gene zur Klonierung von Genen in *Ashbya gossypii* nicht verwendet werden kann.

Es wurde deshalb versucht, da daß dem URA3-Gen oder pyrF-Gen entsprechende Gen aus *Ashbya gossypii* unbekannt ist, dies zu klonieren. Versuche zur Klonierung des *Ashbya*-Gens nach den in der Literatur beschriebenen Methoden über beispielsweise Hybridi-sierung mit URA3-Gen-Fragmenten oder über degenerierte Oligonukleotide auf Basis konservierter Aminosäuresequenzen verschiedener Orotidin-5'-phosphatdecarboxylasen und Screening einer "cDNA-library" mit diesen Oligonukleotiden und der PCR-Technik waren erfolglos (Bergkamp et al., Yeast, Vol. 9, 1993: 677 - 681, Piredda et al., Yeast, Vol. 10, 1994: 1601 - 1612, Benito et al., Gene, Vol. 116, 1992: 59 - 67 und Diaz-Minguez et al., Mol. Gen. Genet., Vol. 224, 1990: 269 - 278).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, deshalb einen leicht selektionierbaren, mit hoher Ausbeute transformierbaren und einfach gegenselektionierbaren Marker zur Verfügung zu stellen, der das Einbringen von Genen in Mikroorganismen ermöglicht.

Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen, die mindestens 80 % Homologie zur Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweisen, gelöst.

Unter Homologe des erfindungsgemäßen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 80 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 90 % Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 % Homologie aufweisen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 1 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine vorteilhafterweise für das Einbringen eines oder mehrerer Gene jedoch erhalten bleiben sollte. Sollen mit Hilfe der SEQ ID NO: 1 und seiner Homologen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen jedoch Mutanten im Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen hergestellt werden, so werden nicht funktionelle Gene das heißt Gene, die zu enzymatisch inaktiven Proteinen führen, verwendet. Dabei werden vorteilhafterweise Sequenzen ver-

4

wendet, die Homologien zur SEQ ID NO: 1 oder seinen Homologen vorteilhaft am 3'- und 5'-Ende aufweisen.

Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise 5 pilzliche oder pflanzliche Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt von mindestens 70 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, ganz 10 besonders bevorzugt von mindestens 90 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die 15 den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschalten sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz 20 in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon 25 so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert bevorzugt erhöht wird.

Bevorzugt läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Mikroorganismen der Familie Metschnikowiaceae, besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattungen Eremothecium, Ashbya oder Nematospora, ganz besonders bevorzugt aus Mikroorganismen der Gattung und Art Eremothecium ashbyii oder Ashbya gossypii isolieren.

35 Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die URA3-Gensequenzen SEQ ID No. 1 und seine Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen 40 um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die 45 natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale

5

10.12.88

vor die Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die URA3-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein, wobei das oder die Gene auch inaktiviert sein können. Mit Hilfe dieses oder dieser inaktivierten Gene können im erfindungsgemäßen Verfahren Uracil-auxotrophe Mutanten erzeugt werden. Zum Einbringen weiterer Gene in einen Mikroorganismus sind im Genkonstrukt vorteilhafterweise weitere Gene enthalten. Diese Gene können innerhalb eines URA3-Genes liegen, wobei vorteilhaft eine intakte Kopie des URA3-Gens und/oder ein anderes selektierbares Gen wie leu2, thr4 oder kan im Konstrukt enthalten sein sollte, oder sie können außerhalb des URA3-Genes liegen. Auch im Falle eines intakten URA3-Gen im Genkonstrukt können noch weitere Marker wie die oben genannten gegebenenfalls zur Selektion im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-_{P_R}- oder im λ-P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, Mfa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der 35 Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren 40 Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Genkonstrukt können wie oben beschrieben noch weitere Gene, 45 die in die Mikroorganismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können innerhalb oder außerhalb der Markergene wie ura3, leu2, thr4 oder kan inseriert sein. Prinzipiell können

6

M 10.12.86

alle Arten von Genen mit Hilfe des erfindungsgemäßen URA3-Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen in Mikroorganismen eingebracht werden. Vorteilhafterweise lassen sich regulatorische Gene wie Gene für Induktoren, Repressoren oder

5 Enzyme, die über ihre enzymatische Aktivität in die Regulation eingreifen, oder ein oder mehrere oder alle Gene eines Biosyntheseweges wie die Gene der Riboflavinbiosynthese wie beispielsweise die rib-Gene oder Gene von Biosynthesewegen, die zu anderen Feinchemikalien, Sekundärmetaboliten oder Proteinen 10 führen wie die Gene der Biotin-, Lysin-, Methionin-, Vitamin B12- oder Carotinoidbiosynthese, oder Gene, die zu Aroma-, Wuchs- oder Geruchsstoffen führen oder einzelne Gene für Enzyme wie Proteasen oder Lipasen über die URA3-Sequenz in Wirtsorganismen einbringen und exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Die eingebrachten Gene können einen eigenen 15 Promotor haben oder aber unter der Regulation des Promotors der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seiner Homologen liegen.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhaftweise in einen Vektor wie beispielsweise 20 einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λgt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, 25 pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2μM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. 30 Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985 , ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

35 Vorteilhaftweise enthält das Genkonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

40 45 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

7

M 10.10.88

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

10 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem 15 linearisierten Plasmid oder nur aus dem Genkonstrukt als Vektor bestehen.

Als Wirtsorganismen für das erfindungsgemäße Genkonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen 20 in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen, tierische oder pflanzliche Zellen verwendet. Bevorzugt werden Pilze oder Hefen, besonders bevorzugt Pilze, ganz besonders bevorzugt Pilze der Familie Metschnikowiaceae wie Eremothecium, Ashbya oder Nematospora verwendet.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Uracil auxotrophen Mikroorganismen. Zur Erzeugung von Uracil auxotrophen Mutanten wird das Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-30 Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen beispielsweise durch Mutagenese so verändert, daß das durch das Gen codierte Protein inaktiviert wird. Dieses inaktivierte Gen wird anschließend in einen Mikroorganismus beispielsweise über Transformation oder Elektroporation eingeführt. Durch homologe Rekombination in den Mikroorganismen entstehen schließlich auxotrophe Mutanten, 35 die über ihre Resistenz gegen 5-Fluororotsäure gescreent werden können (siehe Boeke et al., Mol. Gen. Genet., Vol. 197, 1984: 345 - 346).

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einbringen 40 von DNA in Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man in einen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen (= URA3-Gen) defizienten Organismus bevorzugt einen Mikroorganismus einen Vektor einbringt, der ein intaktes URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen vorteilhafterweise zusammen mit weiterer DNA 45 vorzugsweise mit mindestens einem weiteren Gen enthält, und diesen Organismus auf oder in einem Kulturmedium kultiviert, das kein Uracil enthält. In diesem Medium können nur diese Organismen

8 1 1 0 . 1 0 . 0 0 :

wachsen, die den Vektor erhalten haben. Bevorzugt wird in diesem Verfahren als Vektor eine lineare DNA verwendet. Als Mikroorganismen werden in diesem Verfahren bevorzugt Pilze besonders der Familie Metschnikowiaceae wie Eremothecium, Ashbya oder 5 Nemasprora, besonders bevorzugt Mikroorganismen der Gattung Ashbya verwendet.

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid (insbesondere aber ein Plasmid, das den Replikationsursprung des 2m Plasmids aus S. 10 cerevisiae trägt) verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al., 15 Genetics, Vol. 140, 1995: 973 - 987).

Das erfindungsgemäße URA3-Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen lassen sich vorteilhaft als Selektionsmarker im erfindungsgemäßen Verfahren verwenden. Bevorzugt lassen sich Gene 20 unter Verwendung dieses Selektionsmarkers Gene in Ashbya gossypii einbringen.

Von Vorteil ist weiterhin, daß man bei der Transformation von Ashbya gossypii mit Hilfe dieses Genes selektionieren kann, ohne 25 Fremd-DNA (d.h. DNA, die nicht aus Ashbya gossypii stammt) verwenden zu müssen.

Bei der Transformation von Ashbya gossypii mit dem Gen mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen können beliebige weitere Gene 30 miteingebracht werden. Dadurch ist es möglich, Stämme zu konstruieren, die einzelne Gene oder mehrere Gene in weiteren Kopien entweder auf Plasmiden oder im Genom tragen.

Des weiteren ist es möglich, Ashbya-Stämme zu konstruieren, bei 35 denen chromosomal Kopien von Genen durch die Insertion des URA3 Gens mit der SEQ ID NO: 1 oder seiner Homologen zerstört wurden.

Ein besonderer Vorteil des AgURA3 Gens ist die Möglichkeit, den Marker mehrfach hintereinander im gleichen Stamm zu verwenden. 40 Wenn man 5' und 3' des Gens identische Nukleotidsequenzen in gleicher Orientierung (sogenannte direct repeats) setzt, kann man den AgURA3 Marker bei Bedarf durch Homologe Rekombination und Selektion auf Uracil- und FOA-haltigen Medium wieder entfernen und dann in einer weiteren Runde zusätzliche DNA mit Hilfe dieses 45 Gens einbringen. Ein weiterer Vorteil ist die deutlich höhere Transformationseffizienz im Vergleich zu den Markern thr, leu oder kan.

9 11.12.98

Im erfindungsgemäßen Verfahren enthält der Vektor als weiteres Gen mindestens ein Gen der Riboflavinsynthese. Unter Gene der Riboflavinsynthese sind solche Gene zu verstehen, die an der Synthese im gesamten Stoffwechsel von Riboflavinproduzenten wie 5 Ashbya beteiligt sind.

Beispiele:

Beispiel 1:

10

Herstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*
ATCC10895

15

Genomische DNA aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde nach dem in WO97/03208 beschriebenen Verfahren präpariert. Die genomische Genbank, ausgehend von dieser DNA, wurde nach der in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschriebenen Methode in pRS314 und in YEp351 (Hill et al., Yeast, Vol. 2, 1986: 163 - 167) erstellt. Wie beispielsweise WO97/03208 zu entnehmen ist, sind auch andere Plasmide wie Plasmide der pRS-Reihe (Sikorski und Hieter, Genetics, 1989: 19-27) oder Cosmiden, wie z.B. SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, USA) für die Herstellung 25 der Genbank geeignet.

Beispiel 2:

30

Es wurde zunächst versucht das Gen für die Orotidin-5'-Phosphat-decarboxylase (= OMP-DC) aus *Ashbya gossypii* über eine funktionelle Komplementation einer entsprechenden URA3 auxotrophen Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren.

35

Dazu wurde eine Genbank von genomischer *Ashbya gossypii* DNA in pRS314 erstellt (wie in Beispiel 1 beschrieben). Mit dieser DNA wurde der *S. cerevisiae* Stamm MW3317-21A (Genotyp: MAT α, trp1, ade8ΔKpn, ura3-52, hom3-10, met13, met4, ade2, his3-Kpn, siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell. Biol. 9, 1989: 4432-4440), nach der Lithiumacetat-Methode (siehe z.B. Kramer et al., Mol. Cell. Biol. 9, 1989: 4432-4440) transformiert. Es wurde kein Klon erhalten, bei dem die genomische Deletion des ura3 Gens des *S. cerevisiae*- Stammes durch ein Genfragment aus *Ashbya* komplementiert wurde.

10

11 12 13 14 15

Auch der Versuch über eine funktionelle Komplementation in einer pyrF-Mutante von *E. coli* das URA3 Gen von *Ashbya gossypii* zu klonieren schlug fehl.

5 Beispiel 3:

Auch ein Versuch, das OMP-DC-Gen aus *Ashbya gossypii* über Hybridisierung mit einem Fragment des entsprechenden Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren, gelang nicht.

10

Dazu wurde das komplette URA3-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank entry yscodcd) als Sonde (1,1 kb Länge) verwendet, um eine genomische Cosmid-Genbank von *Ashbya gossypii* (siehe Beispiel 1) zu screenen. Der Versuch wurde wie in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons beschrieben durchgeführt, wobei Hybridisierungstemperaturen von 52°C bis 68°C verwendet wurden. Es konnten keine Klone in der Genbank identifiziert werden, die ein positives Signal mit dem URA3-Gen aus *S. cerevisiae* als Sonde lieferten.

Beispiel 4:

25 Im nächsten Ansatz wurde die Klonierung des Gens für OMP-DC aus *Ashbya gossypii* über Amplifikation von Genfragmenten mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden und der PCR-Technik versucht.

Für diesen Versuch wurden die bekannten Aminosäuresequenzen der 30 verschiedenen Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylasen aus den folgenden Organismen miteinander verglichen und Bereiche ausgewählt, die in allen Enzymen höchstmöglich konserviert sind:

- Aspergillus niger (Acc. number: P07817)
- 35 Aspergillus nidulans (Acc. number: P10652)
- Schizosaccharomyces pombe (Acc. number: P14965)
- Penicillium chrysogenum (Acc. number: P09463)
- Kluyveromyces lactis (Acc. number: P07922)
- Candida albicans (Acc. number: P13649)
- 40 Neurospora crassa (Acc. number: P05035)
- Ustilago maydis (Acc. number: P15188)
- Saccharomyces cerevisiae (Acc. number: P03962)
- Drosophila melanogaster (Acc. number: Q01637)
- Mouse (Acc. number: P13439)
- 45 Human (Acc. number: P11172)

11

M 18.12.98

Die in den Klammer angegebenen Nummern stammen aus der SWISS&PIR-
Translated Datenbank Release 103.

Auf Basis dieser Informationen wurden degenerierte Oligonukleotide
5 synthetisiert.

Unter degenerierten Oligonukleotiden versteht man Oligo-
nukleotide, bei denen während der Synthese an mehreren Positionen
Mischungen von Nukleotiden eingebaut wurden.

10

R steht dabei für G oder A, Y steht dabei für C oder T, W steht
dabei für A oder T, M steht dabei für A oder C, K steht dabei für
G oder T, S steht dabei für C oder G, H steht dabei für A, C oder
T, V steht dabei für A, C oder G, B steht dabei für C, G oder T,
15 D steht dabei für A, G oder T, N steht dabei für G,A,T oder C.

Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

UR43-A: 5'-YTNGGNCCNTAYATHTGY-3'
20 URA3-B: 5'-TAYTGYTGNCNARYTTRTCNCC-3'
URA3-C: 5'-TTYYTNATHTTYGARGAYMGNAARTT-3'
URA3-D: 5'-GCNARNARNARNARNCCNC-3'

Mit diesen Oligonukleotiden als Primer wurden PCR Reaktionen
25 durchgeführt mit genomischer DNA von *Ashbya gossypii* als Matrize
verwendet.

Es wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

30 URA3-A + URA3-B; URA3-A + URA3-D; URA3C + URA3-B and URA3-C +
URA3-D.

Folgende Hybridisierungstemperaturen wurden verwendet:

35 52 °C, 48 °C, 44 °C, 40 °C und 37 °C.

Die aus den PCR-Reaktionen entstandenen Produkte wurden nach
üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega) kloniert und
sequenziert. Es konnten keine Fragmente amplifiziert werden, die
40 Homologie zu bekannten oben genannten OMP-DC Genen zeigten.

Beispiel 5:

Wie in DE 44 20 785 A1 (Beispiel 1) beschrieben wurden eine cDNA-
45 Bank von *Ashbya gossypii* erstellt.

12

M 18.12.98

Beispiel 6:

Analyse von Nukleinsäuresequenzen der Genbank

5 Von E.coli Klonen, die die in Beispiel 5 beschriebene Genbank von Ashbya gossypii enthalten, wurden Einzelklone selektiert. Nach üblichen Methoden wurden die Zellen in geeigneten Medien (z.B. Luria-Broth mit 100 mg/l Ampicillin) kultiviert und Plasmid-DNA aus diesen Zellen isoliert.

10

Es wurde Oligonukleotide, die im Vektoranteil hybridisieren als Primer für die Sequenzierung der cDNA Klone verwendet. Dabei wurden Fragmente der klonierten cDNAs erfasst. Die Sequenzen wurden wie in Beispiel 7 beschrieben analysiert.

15

Beispiel 7:

Es wurde eine Computer-unterstützte Analyse der gefundenen Nukleotidsequenzen über Sequenzvergleiche neu identifizierter

20 Sequenzen mit bestehenden DNA und Proteindatenbanken mit Hilfe folgender Algorithmen z.B. mit BLAST Algorithmen (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), dem Clustal Algorithmus mit Hilfe der PAM250 Gewichtungstabelle oder dem Wilbur-Lipman DNA alignment Algorithmus (wie z.B. in dem Programm Paket MegAlign 25 3.06 der Firma DNASTAR implementiert) durchgeführt. Auf diesem Weg konnten Ähnlichkeiten der neu entdeckten Sequenzen mit bereits bekannten Sequenzen entdeckt und neue Gene oder Teilsequenzen von Genen in ihrer Funktion beschrieben werden.

30 Beispiel 8:

Identifikation von E. coli Klonen, die das Gen für OMP-DC aus Ashbya gossypii (AgURA3) tragen.

35 Nach Untersuchung einer Vielzahl von Klonen wie in Bsp. 6 und 7 (> 100 Klone) beschrieben wurde eine Sequenz gefunden, die Ähnlichkeiten zu den bekannten OMP-DC Genen zeigte. Mit dieser homologen Sonde wurde dann die genomische Ashbya Genbank (siehe Beispiel 1) nochmals gescreent und es konnten Klone bzw. Cosmide 40 identifiziert werden, die ein spezifisches positives Signal ergaben und ein gemeinsames 1,3 kb XhoI-EcoRI-Fragment trugen. Die Sequenzierung der Klone ergab die Sequenz wie in SEQ ID NO: 1 beschrieben. Die Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu bekannten URA3 Genen und codiert für ein ca. 29246 Dalton großes Protein.

45

13

M 10.10.98

Beispiel 9:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens mit Antibiotika-Resistenzgenen

5

Unter Disruption eines Genes versteht man die Zerstörung der Funktionalität einer genomischen Kopie des Gens entweder durch (a) Entfernen eines Teiles der Gensequenz, oder durch (b) der Unterbrechung des Gens durch Einfügung eines Stückes Fremd-DNA in 10 das Gen oder durch (c) Ersatz eines Teils des Gens durch Fremd-DNA. Die verwendete Fremd-DNA ist beliebig, bevorzugt aber ein Gen, das Resistenz gegen eine beliebige Chemikalie bewirkt. Zur Disruption von Genen können beliebige Resistenzgene verwendet werden.

15

Zur Disruption des AgURA3-Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895 wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus Tn903, das unter Kontrolle des TEF-Promotors von *Ashbya gossypii* (siehe Yeast 10, S. 1793-1808, 1994 oder WO92/00379) verwendet. Das Gen ist 5' 20 und 3' von mehreren Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen flankiert, so daß eine Kassette aufgebaut werden konnte, die beliebige Konstruktionen von Gen-Disruptionen mit üblichen Methoden der *in vitro* Manipulation von DNA ermöglichen.

25 Das interne 370 bp PstI-KpnI Fragment von AgURA3 (Position 442 - 892 in der Sequenz SEQ ID NO: 1) wurde durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzt. Das erhaltene Konstrukt erhielt den Namen ura3::G418. Das erhaltene Plasmid läßt sich nach Transformation in *E.coli* vermehren. Das XhoI-SphI-Fragment des Konstruktes ura3::G418 (siehe Figur 1) wurde über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgender Elution der DNA aus dem Gel (siehe Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619, 1979) aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt. Figur 1 zeigt in Abbildung A eine Restriktionskarte des kodierenden Bereichs 30 des AgURA3-Gens und der 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (= 5'-UTR und 3'-UTR). Abbildung B zeigt die Situation nach Insertion der oben beschriebenen Kanamycin-Resistenzkassette (= TEF-kanR).

40 Das Fragment wurde entweder über Protoplastentransformation (Gene 109, 99-105, 1991) oder aber bevorzugt durch Elektroporation (BioRad Gene Pulser, Bedingungen: Küvetten mit Spaltbreite 0,4 mm, 1500V, 25μF, 100Ω) in *Ashbya gossypii* transformiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf G418-haltigem Fest- 45 medium (WO 97/03208).

14

M 18 · 12 · 00

Erhaltene G418-resistente Klone wurden mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press bzw. in F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons) daraufhin untersucht, ob die 5 genomische Kopie des AgURA3 Gens tatsächlich zerstört wurde. Klone, deren AgURA3 Gen zerstört wurde, sind Uracil- auxotroph und resistent gegen 1 mg/ml 5'-Fluoro-Orotsäure (FOA).

10 Beispiel 10:

Disruption der chromosomalen Kopie des AgURA3 Gens ohne Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen

15 Ein besonderer Vorteil der Verwendung von URA3 Genen ist die Möglichkeit sowohl auf An- als auch auf Abwesenheit des Genes zu selektionieren. Man kann mit FOA Mikroorganismen screenen, die ein funktionell inaktiviertes URA3 Gen besitzen, und mit Hilfe 20 der Selektion auf Uracil- Prototrophie auf ein funktionell aktives URA3 Gen selektionieren.

Zur Disruption der genomischen Kopie des URA3 Gens wurde einfachheitshalber ein internes Fragment (= PstI-Fragment) des URA3 Gens aus dem kodierenden Bereich des Gens mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 25 deletiert (Position 442 bis 520 in der Sequenz SEQ ID NO: 1). Die Transformation von *Ashbya gossypii* mit diesem deletierten ura3-Fragment wurde wie in Beispiel 10 beschrieben durchgeführt. Anstelle der Deletion von Teilbereichen des Gens können prinzipiell auch alle anderen Methoden zur Inaktivierung des Gens wie 30 Mutationen über Insertionen, Duplikationen, Reversionen, Austausch mehrerer Nukleotide oder Punktmutationen verwendet werden. Punktmutationen sind weniger bevorzugt, da sie leicht revertieren.

35 Die Selektion der Transformanten wurde durch Resistenz gegen FOA durchgeführt. Im Gegensatz zu Wild-Typ-Klonen sind Klone, die eine Disruption des AgURA3 Gens tragen sind resistent gegen 1 mg/ml FOA.

40

45

15

M 18 · 12 · 98

Beispiel 11:

Verwendung des AgURA3 Gens zum Einbringen weiterer DNA in A. gossypii.

5

Das in WO 97/03208 beschriebene Isocitratlyasegen wurde mit Hilfe des Plasmids pAG100, wie in WO 97/03208 (Beispiel 4 und 5) beschrieben, in AgURA3-Disruptionsmutanten A. gossypii (siehe Beispiel 9 und 10) eingebracht, wobei als Selektionsmarker in 10 A. gossypii anstelle der beschriebenen G418-Resistenz das AgURA3 Gen verwendet wurde.

15

20

25

30

35

40

45

16

SEQUENZPROTOKOLL

M 10.10.98

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen,
Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1380 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: *ura3*

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 210..1013

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..199

17

M 18-12-20

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3' UTR
(B) LAGE: 1014..1380

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTCGAGCAAC TCATTGGAAG CCCTTCGCAA ACGACCTCTA TATCTCGTCT CAAGTTCCCTA	60		
CTATCATGTA TGCTGTCACT ACAGAAAAAT TTTTGTCTAT AGCTGGCAAG AAGCACATCA	120		
CATACATTCT GATGGTGTA GCTCCACATC ACAGTAAGCA TTTGTATAAG GCTGATCACA	180		
TAGGGTGCTA CCGACCTAGC CATTGCCAC ATG TCA ACG AAA TCT TAC GCA GAA	233		
Met Ser Thr Lys Ser Tyr Ala Glu			
1	5		
AGG GCC AAG GCA CAC AAT TCG CCA GTT GCT AGA AAG CTT CTG GCA TTG	281		
Arg Ala Lys Ala His Asn Ser Pro Val Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu			
10	15	20	
ATG CAC GAG AAG AAA ACC AAT CTC TGC GCT TCC CTT GAT GTG CGG ACG	329		
Met His Glu Lys Lys Thr Asn Leu Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr			
25	30	35	40
TCT AGA AAG CTT CTG GAG CTA GCA GAC ACG CTG GGA CCG CAC ATT TGT	377		
Ser Arg Lys Leu Leu Glu Leu Ala Asp Thr Leu Gly Pro His Ile Cys			
45	50	55	
CTG CTG AAG ACA CAT GTC GAC ATA CTG ACG GAC TTC GAC ATC GAG ACG	425		
Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Thr Asp Phe Asp Ile Glu Thr			
60	65	70	
ACA GTC AAG CCG CTG CAG CAG CTT GCG GCT AAG CAC AAC TTC ATG ATC	473		
Thr Val Lys Pro Leu Gln Gln Leu Ala Ala Lys His Asn Phe Met Ile			
75	80	85	
TTC GAG GAC CGC AAG TTC GCT GAC ATT GGC AAC ACG GTT AAG CTG CAG	521		
Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln			
90	95	100	
TAC TCC TCC GGC GTG TAC CGT ATC GCG GAG TGG GCG GAT ATT ACC AAT	569		
Tyr Ser Ser Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn			
105	110	115	120
GCA CAC GGC GTC ACC GGC CCC GGT GTG ATA GCC GGG CTG AAG GAG GCT	617		
Ala His Gly Val Thr Gly Pro Gly Val Ile Ala Gly Leu Lys Glu Ala			
125	130	135	
GCG AAA CTG GCC TCA CAG GAA CCC AGG GGG TTG CTG ATG CTG GCA GAG	665		
Ala Lys Leu Ala Ser Gln Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu			
140	145	150	

18

M 18.10.98

713

CTC TCT TCT CAG GGC TCT TTG GCG CGC GGA GAC TAT ACC GCG GGC GTC
 Leu Ser Ser Gln Gly Ser Leu Ala Arg Gly Asp Tyr Thr Ala Gly Val
 155 160 165

GTT GAA ATG GCG AAG CTG GAC GAA GAC TTT GTG ATC GGG TTC ATC GCG
 Val Glu Met Ala Lys Leu Asp Glu Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala
 170 175 180

CAG CGT GAC ATG GGT GGG CGT GCA GAC GGC TTT GAC TGG CTC ATC ATG
 Gln Arg Asp Met Gly Arg Ala Asp Gly Phe Asp Trp Leu Ile Met
 185 190 195 200

ACC CCG GGG GTT GGC CTG GAC GAC AAA GGA GAC GGC CTG GGC CAG CAG
 Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln
 205 210 215

TAC CGC ACG GTG GAT GAG GTC GTC AGC GAC GGT ACC GAT GTG ATC ATT
 Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val Ser Asp Gly Thr Asp Val Ile Ile
 220 225 230

GTT GGC AGA GGG CTC TTT GAC AAG GGA AGA GAC CCC AAG GTC GAG GGT
 Val Gly Arg Gly Leu Phe Asp Lys Gly Arg Asp Pro Lys Val Glu Gly
 235 240 245

GCC CGC TAC CGC AAG GCC GGT TGG GAG GCT TAC TTG CGC CGT ATG GGC
 Ala Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Met Gly
 250 255 260

GAG ACT TCG TAGTCTATCG CTGGCGCCCA CAGTATATAG GCGGATTCCA
 Glu Thr Ser
 265

CCGCCGATTA CCATCTCAGC AACCTTTTG TAATTATATG CCCCTATTGC CCTTATTCC

1110

GAGCTGGTGC CGGGATCGGT TTATAGACGG GCAACAAGTT GATACTTTGT TCAGTAGCAT

1170

GCATCCAACA CTTGCAGGCT TGGGGTGTGG AAGGCCTCGC CGCGGATAAT TCGTATTACC

1230

CGCACTTCGT GAAAGTATTGC TTTATGAAAAA ATCTTCACTT TGGGCTAACT AGAGCCATAA

1290

CTCGACACAA GCCCCTTCCT ACACACTTCG AGCTGGACT AAAGTGACAA CGAATAGCAA

1350

ATAATTAGCA AATATGGATG CGTTGAATT

1380

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 267 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

19

118 · 12 · 98

Met Ser Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Arg Ala Lys Ala His Asn Ser Pro
1 5 10 15

Val Ala Arg Lys Leu Leu Ala Leu Met His Glu Lys Lys Thr Asn Leu
20 25 30

Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ser Arg Lys Leu Leu Glu Leu Ala
35 40 45

Asp Thr Leu Gly Pro His Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile
50 55 60

Leu Thr Asp Phe Asp Ile Glu Thr Thr Val Lys Pro Leu Gln Gln Leu
65 70 75 80

Ala Ala Lys His Asn Phe Met Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp
85 90 95

Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln Tyr Ser Ser Gly Val Tyr Arg Ile
100 105 110

Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Pro Gly
115 120 125

Val Ile Ala Gly Leu Lys Glu Ala Ala Lys Leu Ala Ser Gln Glu Pro
130 135 140

Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Gln Gly Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Gly Asp Tyr Thr Ala Gly Val Val Glu Met Ala Lys Leu Asp Glu
165 170 175

Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Ala
180 185 190

Asp Gly Phe Asp Trp Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp
195 200 205

Lys Gly Asp Gly Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val
210 215 220

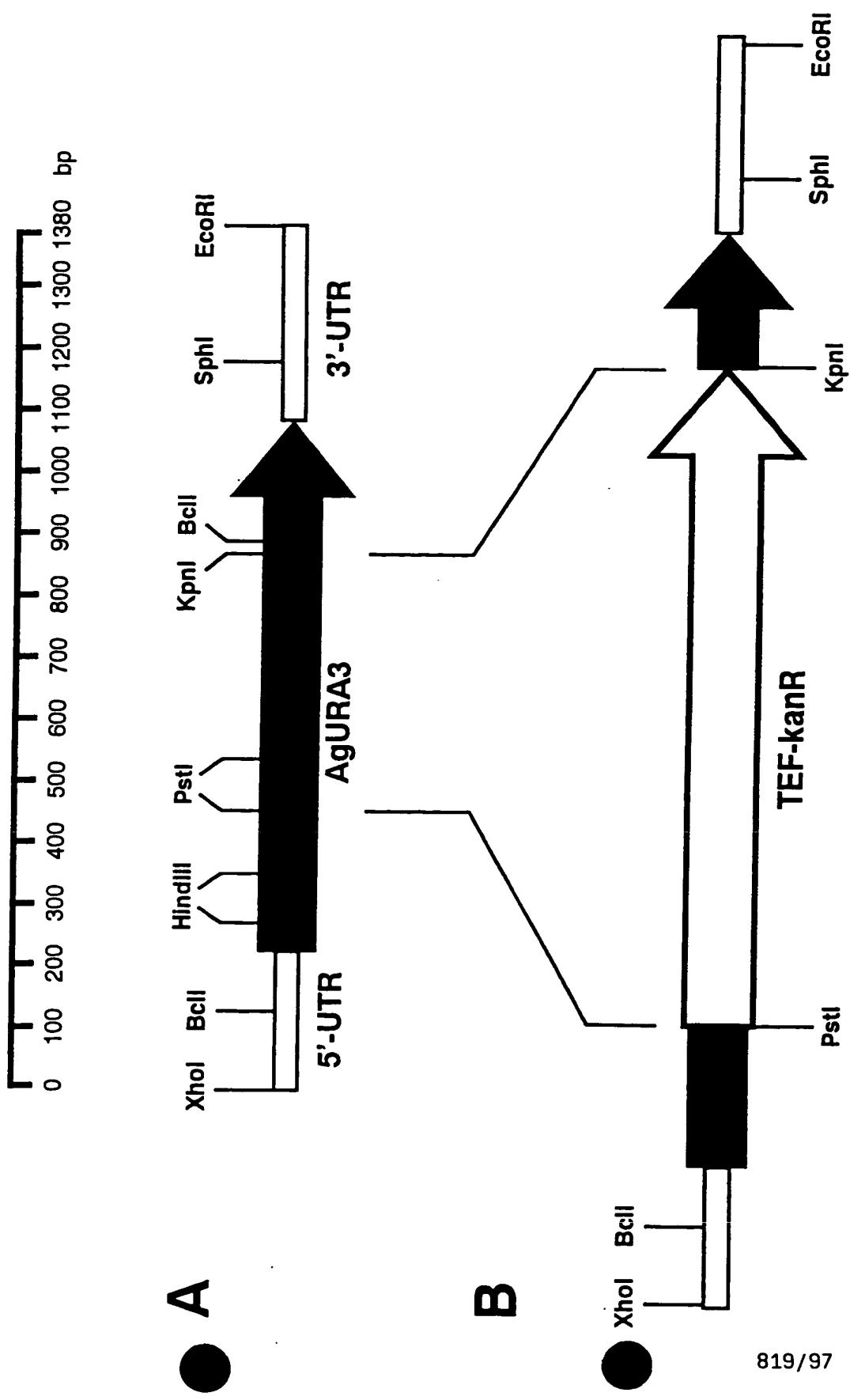
Ser Asp Gly Thr Asp Val Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Asp Lys
225 230 235 240

Gly Arg Asp Pro Lys Val Glu Gly Ala Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp
245 250 255

Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Met Gly Glu Thr Ser
260 265

Figur 1

H 18 · 12 · 98



M 10.12.98

Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen, Genkonstrukt enthaltend dieses Gen und seine Verwendung

5 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen, ein Genkonstrukt enthaltend dieses Gen oder seine Homologen und dessen Verwendung. Die Erfindung betrifft außerdem Vektoren oder Organismen 10 enthaltend ein Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase-Gen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung 15 von Uracil auxotrophen Mikroorganismen sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Uracil auxotrophe Mikroorganismen.

20

25

30

35

40

45